



# Oligoribonucleotide analogues containing triazole linkers: double strand formation and the thermodynamic analysis

著者	鈴木 建
号	84
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	理博第3211号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00125459">http://hdl.handle.net/10097/00125459</a>

# 論文内容要旨

(NO. 1)

氏 名	鈴木 建	提出年	平成 3 0 年
学位論文の 題 目	<p>Oligoribonucleotide analogues containing triazole linkers: double strand formation and the thermodynamic analysis (トリアゾール連結部を含むオリゴリボヌクレオチド類縁体： 二重鎖形成とその熱力学的解析)</p>		

## 論文目次

### 第 1 章 序論

### 第 2 章 トリアゾール連結部をもつオリゴリボヌクレオチドの合成

### 第 3 章 トリアゾール連結部をもつオリゴリボヌクレオチドの翻訳鋳型機能

### 第 4 章 トリアゾール連結部をもつオリゴリボヌクレオチドの二重鎖形成能と熱力学的解析

### 第 5 章 総括

## 論文内容要旨

### 第 1 章 序論

RNA は、mRNA、tRNA、rRNA といった形でセントラルドグマに関わるのみならず、リボザイムや ncRNA などのさまざまな形で生命を支えている。これらの機能性においては RNA の複雑な高次構造が関わっているが、その中心となるのが二重鎖形成能である。さらに、2'位ヒドロキシ基がリン酸ジエステル連結部の加水分解を促すことで、短寿命活性種としての特性を付与する。このうち二重鎖形成能のみを持つ人工 RNA は特異な機能性物質として興味深く、擬糖部を非天然構造により連結した人工 RNA の合成が試みられている。しかし、多量体合成のためには、さまざまな合成的制約条件下、単量体同士の連結効率を極めて高く実現する必要があり類例は多くはない。高効率合成を実現したオリゴヌクレオチドとして、銅触媒アジド・アルキン付加環化 (CuAAC) 反応

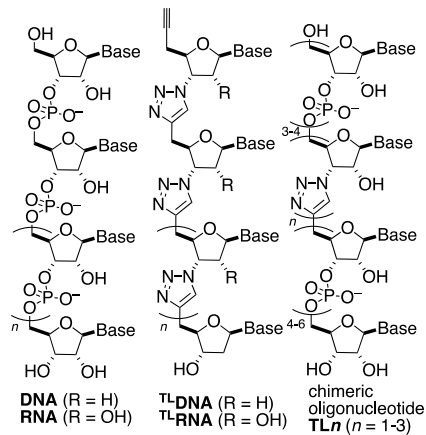


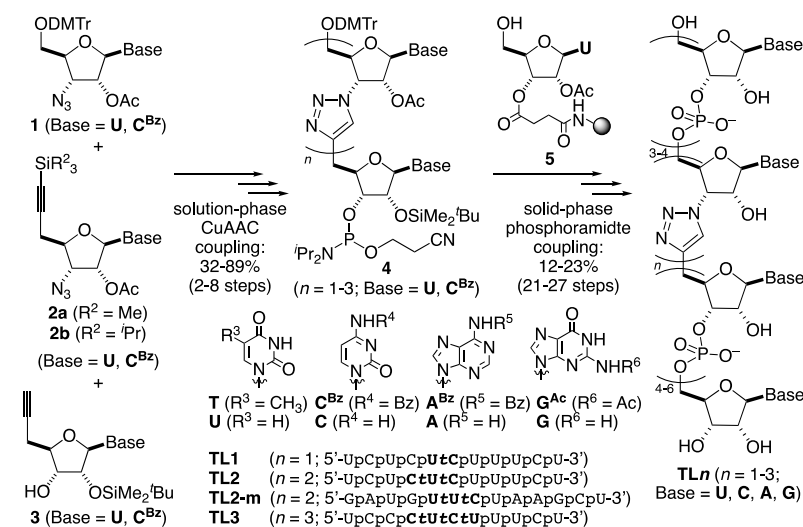
図 1. 核酸とトリアゾール連結型核酸、キメラ型オリゴヌクレオチドの構造

を連結反応に活用した, トリアゾール連結型核酸 ( ${}^{\text{T}}\text{DNA}$ ,  ${}^{\text{T}}\text{RNA}$ , 図 1) がある.  ${}^{\text{T}}\text{DNA}$  では, チミン 10 量体の合成が実現されているが,  ${}^{\text{T}}\text{RNA}$  については, 3 量体までの合成がなされたのみであった. トリアゾール連結部をもつ中・長鎖 RNA 型オリゴヌクレオチドの合成は合成化学的にも機能探索の観点からも興味深い.

## 第 2 章 トリアゾール連結部をもつオリゴリボヌクレオチドの合成

トリアゾール連結部をもつ RNA 型オリゴリボヌクレオチドの合成のため, 多段階合成の要請に応えられる二種の高効率な合成手法を開発した. まず,  ${}^{\text{T}}\text{RNA}$  と天然 RNA との混合構造をもつキメラ型オリゴヌクレオチド  $\text{TLn}$  ( $n=1-3$ ) の合成法として, 液相合成と固相合成を組み合わせた手法を確立した (スキーム 1). 5'末端単量体 **1**, 伸長単量体 **2**, 3'末端単量体 **3** の三種

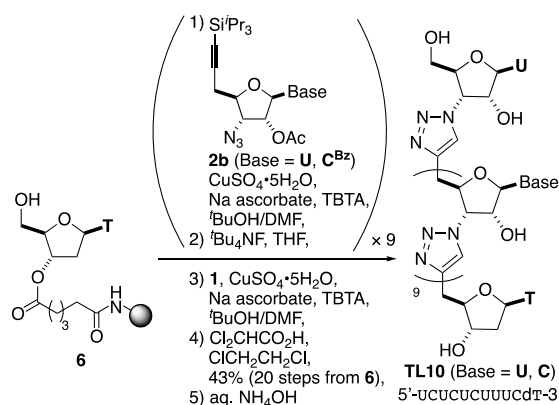
スキーム 1. 液相合成と固相合成を組み合わせた  $\text{TL1-3}$  合成法



の単量体を液相中で CuAAC 反応によって連結することで, 長さの異なるオリゴヌクレオチド **4** を 2-8 工程, 総収率 32-89% で合成した. **4** を天然 RNA 合成に汎用されているホスホアミダイト固相合成法の伸長単位に適用することで, キメラ型オリゴヌクレオチド  $\text{TL1-3}$  を, **5** から 21-27 工程, 総収率 12-23% で合成した. 続いて, トリアゾール連結部のみからなるトリアゾール連結 RNA オリゴヌクレオチド  $\text{TL10}$  の合成手法を開発した (スキーム 2). 固相に担持した単量体 **6** に対して, **2b** との CuAAC 連結反応を伸長反応とし, その後のアセチレン部の脱保護反応との組み合わせからなる伸長工程を 9 回繰り返した. 最終段階では, 5'位ヒドロキシ基を持つ 5'末端単量体 **1** を連結し, 11 量体を合成した. 脱トリチル化

反応から生成するカチオン種を定量することで, **6** からの 20 段階の総収率を 43% と決定した. オリゴヌクレオチド  $\text{TL10}$  は, 塩基性条件下で脱保護と固相からの切り出しを行い, HPLC により精製した. これらの二種類の合成手法を確立することで, 複数のトリアゾール連結部を RNA 構造中に自在に導入可能とした.

スキーム 2. オリゴヌクレオチド  $\text{TL10}$  の固相合成



### 第 3 章 トリアゾール連結部をもつオリゴヌクレオチドの翻訳鋳型機能

キメラ型オリゴヌクレオチド **TL2-m1** が、遺伝子翻訳反応における鋳型 mRNA として機能することを見出した。mRNA は、その 3 塩基をコドン単位としてタンパク質のアミノ酸配列を記述する。mRNA 代替物として、トリアゾール連結型 **U $\pi$ U $\pi$ C** 部位をもつ **TL2-m1** (図 2a) を翻訳反応に適用したところ、その記述するアミノ酸配列をもつジペプチド fMet-Phe が生成した。これはトリアゾールという非天然型連結部が、リボソーム・tRNA による翻訳反応を阻害しないのみならず、その翻訳鋳型基質として機能したことを示している。放射性同位体を用いた翻訳産物の定量解析から、**TL2-m1** を用いた場合には天然 RNA を用いた場合よりも、1.8 倍多く fMet-Phe が生成していることがわかった (図 2b)。さらに、この **TL2-m1** は、Phe-tRNA と一塩基異なるアンチコドン部をもつ Leu/Ile-tRNA をも誘引し、天然 RNA と比較して fMet-Leu/Ile を 3.1 倍量生成させたことがわかった。これらのことからトリアゾール連結型 mRNA は、天然 mRNA を凌駕する翻訳効率を示す一方で、アミノ酸への忠実性は高くなく、様々なアミノ酸を許容する特質を持つことを明らかにした。

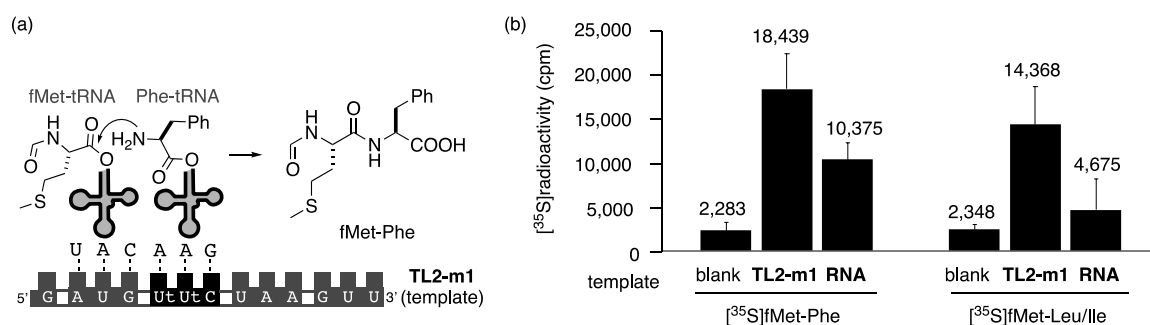


図 2 (a) **TL2-m1** の記述するアミノ酸配列. (b) **TL2-m1** を鋳型とした翻訳産物.

### 第 4 章 トリアゾール連結部をもつオリゴヌクレオチドの二重鎖形成能と熱力学的解析

トリアゾール連結部をもつオリゴヌクレオチド **TL $n$**  ( $n=1-3, 10$ ) が、相補的配列を持つ天然 RNA と二重鎖形成することを明らかにし、トリアゾール連結部が及ぼす二重鎖の安定性・熱力学的影響を明らかにした。**TL $n$**  とその相補鎖 RNA 混合物の温度依存 UV-vis 測定では、二重鎖形成に由来した 260 nm の吸光度の変化が観測された (図 3a)。熱的安定性はトリアゾール連結部の数が多いほど低くなること

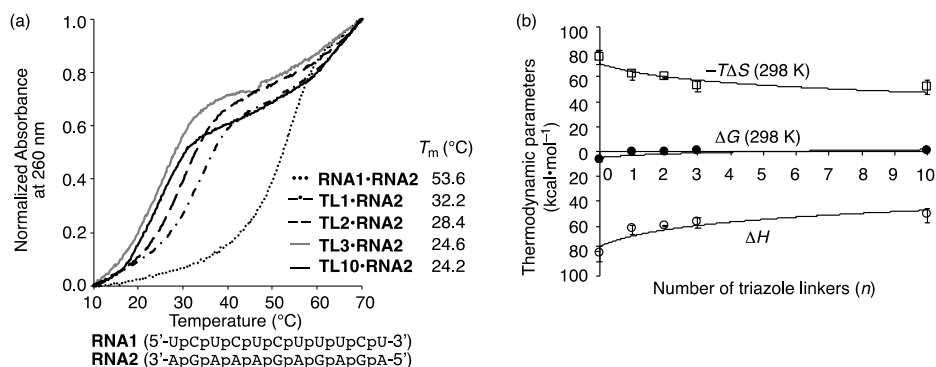


図 3 (a) **TL $n$**  と相補的 RNA の二重鎖形成における融解曲線. (b) 二重鎖形成における熱力学的パラメータ.

(NO. 4)

が二重鎖の融解温度解析からわかった。さらに、融解曲線に二状態近似モデルを適用し熱力学パラメーターを求めたところ、トリアゾール連結部が多いほど、二重鎖形成でのエンタルピー利得が減じ、エントロピー利得が増すことがわかった (図 3b)。動力学法計算による解析と併せ、エンタルピー利得の減少は、トリアゾール連結部が核酸塩基間の距離を増すことに由来することが示唆された。

## 第 5 章 総括

本博士論文では、トリアゾール連結部を含むオリゴリボヌクレオチド合成法を開発し、その翻訳反応における mRNA としての機能を開拓した。さらにトリアゾール連結部を含むオリゴヌクレオチドの二重鎖形成能を解析することで、トリアゾール連結部が RNA 二重鎖に対してはエンタルピー的には不利となることを明らかにした。これらの知見は、非天然型連結部をもつ RNA オリゴヌクレオチドの基礎的性質および活用法を示したものとなる。

## 別 紙

### 論文審査の結果の要旨

「トリアゾール連結部を含むオリゴリボヌクレオチド類縁体：二重鎖形成とその熱力学的解析」と題した鈴木建氏の博士論文は全 5 章から構成されている。擬糖部を非天然型のトリアゾール連結部により連ねたオリゴリボヌクレオチドを合成し、その機能開拓ならびに基本となる構造化学を解き明かした研究がまとめられている。

第 1 章では、博士論文の研究背景となる非天然型連結部をもつ RNA の合成・二重鎖形成能・機能が概説されている。関連した人工核酸研究における、合成と機能性の現状がまとめられており、本博士論文の主題となる人工 RNA の意義付けがなされている。

第 2 章では、トリアゾール連結部をもつ RNA 型オリゴヌクレオチドの二種の合成法の開発研究がまとめられている。最初にトリアゾール連結部とリン酸ジエステル連結部が混合したキメラ型オリゴリボヌクレオチドの合成法が述べられ、その後、別法となるトリアゾール連結部のみからなるトリアゾール連結 RNA オリゴリボヌクレオチドの合成法が述べられている。いずれの合成法においても、多段階合成の要請に応えられる高効率な結合生成法が開発され、1 1 量体オリゴヌクレオチドの合成がなされている。

第 3 章では、トリアゾール連結部を含むオリゴリボヌクレオチドが、遺伝子翻訳反応における鋳型 mRNA として機能することが述べられている。トリアゾールという非天然型連結部が、リボソーム・tRNA による翻訳反応を阻害しないのみならず、その翻訳鋳型基質として機能することが明示されている。さらに、天然型 mRNA との比較により、翻訳反応における効率と精度に対する非天然型連結部の影響を明らかにしている。

第 4 章では、オリゴリボヌクレオチドの機能を理解する上で、最も基本的な知見となる二重鎖形成能について述べられている。トリアゾール連結部の数が異なる数種のオリゴリボヌクレオチドを用い、構造・機能相関研究が行われ、二重鎖の安定性のみならず、トリアゾール連結部のおよぼす熱力学的影響が解き明かされている。

第 5 章では、博士論文のまとめと今後の展望が述べられている。

以上、本博士論文は、鈴木建氏が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、鈴木建氏提出の博士論文は、博士（理学）の学位論文として合格と認める。